

Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) **EP 1 201 679 A2**

(12) **EUROPEAN PATENT APPLICATION**

(43) Date of publication:
02.05.2002 Bulletin 2002/18

(51) Int Cl.7: **C07K 4/08, C07K 1/12,**
A23L 1/305
// (C07K4/08, 123:00)

(21) Application number: 01125636.9

(22) Date of filing: 26.10.2001

(84) Designated Contracting States:
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE TR
Designated Extension States:
AL LT LV MK RO SI

- Kobayashi, Akio
1-15-10, Wakagi, Itabashi-ku, Tokyo (JP)
- Funayama, Katsura
1-15-10, Wakagi, Itabashi-ku, Tokyo (JP)
- Kahara, Takashi
Chiyoda-ku, Tokyo (JP)
- Nakano, Takahisa
Chiyoda-ku, Tokyo (JP)

(30) Priority: 27.10.2000 JP 2000329566

(71) Applicant: **RIKEN VITAMIN CO., LTD.**
Chiyoda-ku, Tokyo (JP)

(74) Representative:
TER MEER STEINMEISTER & PARTNER GbR
Patentanwälte,
Mauerkircherstrasse 45
81679 München (DE)

(72) Inventors:

- Sato, Minoru
Aoba-ku, Sendai-shi, Miyagi-ken (JP)
- Ooba, Takashi
Aoba-ku, Sendai-shi, Miyagi-ken (JP)

(54) **Angiotensin I-converting enzyme inhibitory substance**

(57) The subject of the invention is to produce a peptide with potent the angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity by decomposing the protein contained in wakame with protease, using wakame being a food material ingested daily as a raw material, and to provide a safe food composition with hypotensive activity, using the treatment product thereof as a raw material.

The inventors have found that, when performing the decomposing treatment of wakame with various proteases, a group of endo-type enzymes produced by *Bacillus* produce peptides with particularly strong ACE inhibitory activity, leading to the completion of the invention.

EP 1 201 679 A2

Description

BACKGROUND OF THE INVENTION

5 [0001] The present invention relates to an angiotensin I-converting enzyme (hereinafter, abbreviated as ACE) inhibitory substance with blood-pressure lowering activity, in more detail, peptide with potent ACE inhibitory activity obtained by decomposing wakame (*Undaria pinnatifida*) (a kind of brown seaweed family) with protease.

[0002] The hypertension is one of the causes liable to induce the arterial sclerosis together with hyperlipidemia, diabetes and obesity. The population diagnosed as being hypertension is presumed to be twenty millions or more in 10 Japan, and the potential hypertension is also said to run to a considerable number. In recent years, the diagnostic criterion for the hypertension has become severe, but the hypertension is said to be a silent killer. Though symptomless, if leaving it as it is, it often incurs the death, hence it is one of the diseases of which the life habit is said to be important. For improving this hypertension, the development of hypotensor drugs and food components for regulating blood pressure is being put forward positively at many research organizations.

15 [0003] In the organism, the renin-angiotensin system is an important factor that regulates blood pressure and the balance of quantity of water in body with electrolytes. The renin secreted from juxtaglomerular cells of kidney into circulating blood acts on the angiotensinogen being biosynthesized in liver and existing in blood to make angiotensin I. The angiotensin I becomes angiotensin II with ACE in the endothelial cell of blood vessel. The angiotensin II has three major physiological actions; ① it contracts the smooth muscle of blood vessel very strongly to increase the blood 20 pressure, ② it promotes the secretion of aldosterone from adrenal cortex into blood, and ③ it acts on the proximal tubules of kidney to enhance the reabsorption of sodium filtered through glomerulus. All of these actions work so as to increase the blood pressure. In addition, the ACE decomposes bradykinin having an action to dilate the smooth muscle of blood vessel to inactivate it. As described, the ACE has the activation of renin-angiotensin system (hypertensive system) and the inactivation of kallikrein-kinin system (hypotensive system) at the same time and, as a result, 25 it exhibits the action to increase the blood pressure. Hence, a substance that inhibits the activity of ACE can suppress an increase in the blood pressure, thus, medicinal drugs and foods containing inhibitory substance are being developed, focusing thereon.

[0004] As a substance with potent ACE inhibitory activity using food material as a raw material, it is known that peptide obtained by decomposing the protein of animals and plants with a certain kind of protease is effective. As the 30 peptides with potent ACE inhibitory activity are producible with protease, those using raw materials from animals and plants such as tuna (Patent Publication No. 2049147), sap of fig tree (Patent Publication No. 2794094), antarctic krill (Patent Publication No. 2088612), soy protein (Patent Publication No. 1976328), sardine (Patent Publication No. 2086032), casein (Patent Publication No. 1814531), dried bonito (Kokai No. Hei 04-69397), gluten (Kokai No. Hei 04-66594) and rice protein (Kokai No. Hei 04-279529) are disclosed. Thereamong, however, substances put into practice are very few. For the reasons, it is mentioned that insufficient effect and taste and odor make it difficult to be used for foods, and the like. Moreover, those using raw materials from seaweeds such as laver (Patent Publication No. 2678180) and hijiki (Kokai No. Hei 10-36391) are disclosed, and the applicant has also confirmed the ACE inhibitory effect as for four kinds of tetrapeptides obtained by hydrolyzing wakame (Patent Application No. Hei 11-284647). Furthermore, a health food containing enzymolysis product of seaweed (Kokai No. Hei 07-289202) is also disclosed. These 40 inventions using laver, hijiki and wakame as raw materials use pepsin in all cases as a protein hydrolase to obtain peptides with potent ACE inhibitory activity.

[0005] In the side of science or medicinal drug, it is important to identify the physiologically active substance and use it after isolation and purification, but, when considering the utilization as a food, the use thereof after its isolation and purification is not necessarily practical in the industry from the points of economics etc. When utilizing as a food 45 composition, a crude fraction or lightly purified fraction of decomposition product of protein is actually practical in many cases. Moreover, the products obtained by hydrolyzing protein using pepsin as a protease have bad taste for utilizing as foods and further the blood-pressure lowering activity of crude fraction or lightly purified fraction thereof is not necessarily effective.

[0006] Moreover, in Kokai No. Hei 07-289202, a method of obtaining peptide by hydrolyzing Kombu (*Laminaria*) with alkalase is disclosed, but there is no description on blood pressure in this patent.

50 [0007] A superaging society has come in Japan and advanced nations and increased medical expenses has become a serious problem. Moreover, it is also a problem that, though the average life span is extended, aged persons who cannot spend a healthy social life because of being bedridden or dementia are increasing. From the viewpoint of improving such problems, a way of thinking to perform the maintenance and promotion of health with daily foods is 55 now penetrating.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0008] The subject of the invention is to produce a peptide with potent ACE the inhibitory activity by decomposing the protein of wakame with protease, using wakame being a food material ingested daily as a raw material, and to provide a safe food composition with blood-pressure lowering activity, using the treatment product thereof as a raw material.

[0009] In view of said subject, the inventors have found that, when performing the decomposing treatment of wakame with various proteases, a group of endo-type enzymes produced by Bacillus produce peptides with potent particularly strong ACE inhibitory activity, leading to the completion of the invention.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0010] The proteases to be used in the invention are endo-type enzymes. The decomposition products obtained by hydrolyzing with exo-type enzymes show only weak ACE inhibitory activity.

[0011] As the endo-type enzymes, enzymes produced by Bacillus, preferably Bacillus subtilis and Bacillus stearothermophilus, are used. When performing the decomposing treatment of wakame with these protein hydrolases, a group of peptides with potent particularly strong ACE inhibitory activity can be produced, and, with papain, bromelain, pancreatin, Aspergillus enzymes and Rhizopus enzymes being other publicly known proteases, production of the group of peptides with strong ACE inhibitory activity as shown in the invention cannot be obtained.

[0012] Although the ACE inhibitory activity of decomposition product with pepsin described in Kokai No. Hei 11-284647 falls under the strong category, the extent of action thereof is weaker than that with said enzymes according to the invention, and further the peptide of peptic digest of wakame have a bitter taste.

[0013] Moreover, even if said enzymes according to the invention may be used, when the kind of raw material seaweed differs, the peptides with as strong ACE inhibitory activity as wakame cannot be obtained and, in some cases, the ACE inhibitory activity cannot be obtained at all. Namely, it can be said that, for the inventive enzymes, the protein of wakame is a preferable substrate to produce the substances with ACE inhibitory activity.

[0014] When decomposing the wakame with the inventive proteases, it is preferable to conduct at the optimum temperature and optimum pH value of those enzymes from the aspects of shorting of reaction time and stability of enzyme, but, if being under conditions within a common-sense range, the objects can be obtained. Moreover, even if both enzymes produced with Bacillus subtilis and Bacillus stearothermophilus may be reacted in sequence, the peptides with strong ACE inhibitory activity can be obtained.

[0015] With respect to the wakame to be used as a raw material, all portions of leaf, stalk and sporophyll of wakame may be all right. Moreover, with respect to the leaf of wakame, any of dried wakame, boiled and salt-cured wakame, salt-cured wakame and raw wakame may be all right, and the thickness of leaf, color or habitat is not minded. Namely, irrespective of the habitat of raw material wakame and its shape, the peptides with equal ACE inhibitory activity can be obtained.

[0016] Moreover, in order to simplify manufacturing process and make efficient decomposition rate of protein into wakame, it is preferable that alginic acid exists in wakame remove by using of alginic acid lyase at first step of the process, it is expedient to obtain the peptides of wakame. Generally, in the case of wakame being in aqueous solution more than pH 4, the alginic acid into wakame dissolves out, hence the viscosity of solution is very high. Such high viscosity solution is different to stir, separate to solid-liquid and ultrafilter. By pretreatment with alginic acid lyase, alginic acid is degraded to low-molecular saccharide. In that case, the viscosity of solution decreases, leading to improved workability. Even if it uses alginic acid lyase, there is not change of ACE inhibitory activity.

[0017] Since the peptides obtained in the invention have less specific unpleasantness in taste and odor, it is preferable to ingest them by oral administration. The dose differs depending on the age and the extent of blood pressure, but it is usually 10mg to 2000mg at once and the effect is obtained once to thrice a day.

[0018] The wakame peptides obtained in the invention can be administered by themselves or after mixed appropriately with excipient etc. for the convenience of pharmacy to convert to the shapes of powder, granule, tablet, capsule, etc. Also, it is possible to ingest by formulating or mixing with various foods such as candy, jelly, tablet cake, beverage, soup, noodles, rice cracker, Japanese cake, cold cake and baked cake.

[0019] In following, the invention will be illustrated in detail based on examples.

<Example 1>

[0020] Flaky dried wakame was pulverized with ultracentrifugal pulverizer to make the particle diameter 0.2mm or less and 900g of this powder were suspended and dispersed into 18kg of water. Then, 0.09g of alginic acid lyase (from Nagase Biochemical Industries Co.) were added thereto and the mixture was treated for 18 hours at 45°C. The treated product was centrifuged for 5 minutes at 5000rpm. The precipitates were washed with water, dried and then pulverized

to obtain a sample for treating with protease.

[0021] Into 25ml of water was suspended and dispersed 1g of this sample and, after 10mg of each protease were added, the decomposing treatment with enzyme was performed for 18 hours at a fixed temperature and pH condition. For the adjustment of pH value, sodium hydroxide and hydrochloric acid were used. After decomposition with enzyme, the product was boiled for 15 minutes at 100°C to inactivate the enzyme. The precipitates were removed by centrifugation at 100,000rpm for 10minutes to obtain a supernatant. This supernatant were ultrafiltered (Ultra Free-MC, from Millipore Corp., fractional molecular weight 10,000) and were used assay for ACE inhibitory activity.

[0022] The ACE inhibitory activity was determined by following method.

[Method of determining the ACE inhibitory activity]

[0023] Substrate solution:

12.5mM Hippuryl-L-histidiny-L-leucine (from Sigma Corp.)

A solution of 25mg of hippuryl-L-histidiny-L-leucine dissolved into 4.6ml of boric acid buffer at pH 8.3.

[0024] Solution of ACE:

250mU/ml ACE (from Sigma Corp.)

A solution of 0.25U of ACE dissolved into 1ml of boric acid buffer at pH 8.3.

[0025] Into a test tube were taken 35μl of protease-treated solution obtained by ultrafiltration, and 100μl of substrate solution and 35μl of solution of angiotensin-transforming enzyme were added, which was reacted for 1 hour at 37°C. Then, 125μl of 0.5N hydrochloric acid were added to stop the reaction, and 2ml of ethyl acetate were added, followed by violent shaking. The solution was centrifuged for 10 minutes at 2,500rpm and 1.5ml of ethyl acetate layer was sampled. After ethyl acetate was removed from this ethyl acetate layer under reduced pressure while replacing with nitrogen, 700μl of 1M NaCl solution were added and the quantity of hippuric acid extracted was measured from the absorbance at 228nm to obtain the enzyme activity. The ACE inhibitory activity was calculated from following formula:

$$\text{ACE Inhibitory activity (\%)} = (A-B)/A \times 100$$

A: Absorbance when ACE inhibitor is not contained

B: Absorbance when ACE inhibitor is added

[0026] The activity of an ACE inhibitory content was expressed as the amount needed to inhibit 50% of ACE activity (IC50) under these conditions.

[0027] Table 1 shows 18 kinds of enzymes offered to test and their origins, and Table 2 shows the conditions of enzyme treatment (temperature and pH value) and the ACE inhibitory activity (%).

[0028] Besides, with respect to Protease S "Amano", Protease N "Amano" and Proleather FG-F, which exhibited ACE inhibitory activity effectively, tests of two-stage reaction of treatment with Protease S "Amano" followed by treatment with Proleather FG-F (Sample No. 20), and two-stage reaction of treatment with Protease S "Amano" followed by treatment with Protease N "Amano" (Sample No. 21) were performed, respectively.

Table 1:

Proteases offered to Example 1			
No. of sample	Name of product	Manufacturing company	Origin of enzyme
1	Protease S "Amano"	Amano Pharmaceutical	Bacillus stearothermophilus
2	Bioblase SP-15 FG	Nagase Biochemical Industries	Bacillus subtilis
3	Proleather FG-F	Amano Pharmaceutical	Bacillus subtilis
4	Protease N "Amano"	Amano Pharmaceutical	Bacillus subtilis
5	Pepsin	Amano Pharmaceutical	Animal stomach
6	Denapsin	Nagase Biochemical Industries	Aspergillus niger
7	Newlase F	Amano Pharmaceutical	Rhizopus niveus
8	Protease P "Amano" 3G	Amano Pharmaceutical	Aspergillus mellens
9	Protease M "Amano"	Amano Pharmaceutical	Aspergillus oryzae

EP 1 201 679 A2

Table 1: (continued)

Proteases offered to Example 1			
No. of sample	Name of product	Manufacturing company	Origin of enzyme
10	XP-415	Nagase Biochemical Industries	Rhizopus delemar
11	Umamizyme	Amano Pharmaceutical	Aspergillus oryzae
12	Protease A "Amano" G	Amano Pharmaceutical	Aspergillus oryzae
13	Pancreatine F	Amano Pharmaceutical	Animal pancreas
14	Alkalase 2.4L FG	Nobonordisk Bioindustry	Bacillus licheniformis
15	Papain W-40	Amano Pharmaceutical	Carica papaya L.
16	Denazyme AP	Nagase Biochemical Industries	Aspergillus oryzae
17	Blomelain F	Amano Pharmaceutical	Pineapple cannery
18	Purified papain for foods	Nagase Biochemical Industries	Carica L.
19	Peptidase R	Amano Pharmaceutical	Rhizopus oryzae
20	Protease S "Amano" → Proleather FG-F		
21	Protease S "Amano" → Protease N "Amano"		

Table 2:

Test conditions of Example 1 and results of inhibitory activity on angiotensin-transforming enzyme			
No. of sample	Test conditions		Inhibitory activity (%)
	Temperature (°C)	pH	
1	70	8.0	91.0
2	65	10.0	83.6
3	60	10.0	82.2
4	55	7.0	76.8
5	45	2.0	74.0
6	50	3.0	60.0
7	45	3.0	58.5
8	45	8.0	56.3
9	50	4.5	55.1
10	55	3.0	52.4
11	50	7.0	50.2
12	50	7.0	32.7
13	45	9.0	25.2
14	60	7.0	22.4
15	65	7.0	17.5
16	50	7.0	0
17	60	9.0	0
18	70	7.0	0
19	45	7.0	0
20	70→60	8.0→10.0	95.0

Table 2: (continued)

Test conditions of Example 1 and results of inhibitory activity on angiotensin-transforming enzyme			
No. of sample	Test conditions		Inhibitory activity (%)
	Temperature (°C)	pH	
21	70→55	8.0→7.0	85.0

<Example 2>

[0029] After 100ml of water were added to 2g of flaky dried wakame to swell, this was washed with water. Then, 100ml of water and 20mg of protease were added and the mixture was submitted to enzymolysis treatment for 18 hours at a fixed temperature and pH condition. For the adjustment of pH value, sodium hydroxide and hydrochloric acid were used.

[0030] After enzymolysis, the product was boiled for 15 minutes at 100°C to inactivate the enzyme. After cooling by allowing to stand, this was centrifuged for 5 minutes at 20,000rpm to obtain a supernatant. Water was added to this supernatant and the volume was adjusted accurately to 150ml. Then, part of this was treated by ultrafiltration (Ultra Free-MC, from Millipore Corp., fractional molecular weight 10,000) to obtain a permeated solution. This permeated solution was diluted appropriately and the ACE inhibitory activity was determined to obtain IC50 value. The proteases offered to test, hydrolysis conditions and results are shown in Table 3.

Table 3:

Proteases offered to Example 2 and inhibitory activity on angiotensin-transforming enzyme			
No. of enzyme sample offered (Table 1)	Test conditions		Inhibitory activity (IC50)
	Temperature (°C)	pH	
1	70	8.0	86
3	60	10.0	117
4	55	7.0	160
5	45	2.0	220

<Example 3>

[0031] To 200g of boiled and salt-cured wakame were added 3000ml of water and 3mg of alginic acid lyase, and the mixture was submitted to enzymolysis treatment for 18 hours at 45°C. After reaction, the product was centrifuged for 5 minutes at 5000rpm and the precipitates were washed with water, dried and then pulverized to obtain a sample. Each 1g of this sample was treated similarly to Example 1, using each 10mg of four kinds of proteases shown in Table 3 to determine the ACE inhibitory activity.

[0032] The respective inhibitory activities (%) were Protease S "Amano": 89%, Proleather FG-F: 84%, Protease N "Amano": 75% and pepsin: 72%, thus giving the same results as in Example 1 wherein dried wakame was used.

[0033] Each of the wakame peptides obtained by using Proleather FG-F, Protease S "Amano" and pepsin was given by single oral administration (forced administration by stomach sonde) at a dose of each 100mg/kg to male spontaneously hypertensive rats (SHR) of 11 weeks old (3 rats per group of plot, rats with systolic pressure of 180mmHg or higher were used), and the blood pressure was measured at 3, 6, 9 and 24 hours after administration. The blood pressures at the time of start and at 6 hours and 24 hours after administration are shown in Table 4.

Table 4:

Results of Example 4			
Plot	blood pressure (mmHg)		
	At the time of start	At 6 hours after administration	At 24 hours after administration
Control (water)	200.5	197.2 (-3.3)	207.3
Prorazor FG-F	207.0	186.8 (-20.2)	206.1

Table 4: (continued)

Results of Example 4			
Plot	blood pressure (mmHg)		
	At the time of start	At 6 hours after administration	At 24 hours after administration
Protease S "Amano"	201.3	180.1 (-21.2)	204.4
Pepsin	206.2	196.0 (-10.2)	215.2
Note-1) Control plot: Number of rats=6			
Note-2) Bracket in the column of "At 6 hours after administration" is changes in systolic blood pressure of SHR at 6hours after oral administration.			

[Comparative example]

[0034] Replacing flaky dried wakame in Example 2 with powder of Kombu (Laminaria, brown seaweed family), similar treatment was performed. As a result, in all treatment products with proteases, no inhibitory activity on angiotensin-transforming enzyme was recognized.

[0035] In accordance with the invention, by using the wakame peptides obtained by decomposing wakame with endo-type enzymes originating from Bacillus, high-safety food materials with hypotensive activity can be obtained.

Claims

1. An angiotensin I-converting enzyme inhibitory substance, containing peptide obtained by decomposing wakame with protease other than pepsin.
2. The angiotensin I-converting enzyme inhibitory substance of Claim 1, wherein the protease is an endo-type protease originating from Bacillus.
3. A decomposition conduct of protein with blood-pressure lowering activity **characterized by** containing a peptide with potent an angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity wherein said peptide is obtained by decomposing wakame with a protease other than pepsin.
4. A food composition employing the decomposition product of protein defined in claim 3 as a starting material thereof.
5. A preparing method of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory substance, **characterized by** decomposing wakame with protease other than pepsin to give a peptide with potent an angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity.
6. The preparing method of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory substance defined in claim 5, wherein wakame is subject to a pretreatment with alginic acid lyase to remove alginic acid present in wakame and thus pretreated wakame is subjected to a decomposition with a protease other than pepsin to give a peptide with potent an angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity.

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 5 月 30 日 (30.05.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/044044 A1

(51) 国際特許分類: C07K 5/08,
A61K 38/55, A61P 9/00, 9/12, 43/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/12197

(22) 国際出願日: 2002 年 11 月 21 日 (21.11.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2001-355923
2001 年 11 月 21 日 (21.11.2001) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 森永乳業株式会社 (MORINAGA MILK INDUSTRY CO., LTD.) [JP/JP]; 〒108-8384 東京都港区芝五丁目 3 番 1 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 田村 吉隆 (TAMURA, Yoshitaka) [JP/JP]; 〒228-8583 神奈川県座間市東原五丁目 1 番 8 3 号 森永乳業株式会社 栄養科学研究所内 Kanagawa (JP). 宮川 博 (MIYAKAWA, Hiroshi) [JP/JP]; 〒228-8583 神奈川県座間市東原五丁目 1 番 8 3 号 森永乳業株式会社 栄養科学研究所内 Kanagawa (JP). 山田 明男 (YAMADA, Akio) [JP/JP]; 〒228-8583 神奈川県座間市東原五丁目 1 番 8 3 号 森永乳業株式会社 栄養科学研究所内 Kanagawa (JP). 齋藤 仁志 (SAITO, Hitoshi)

[JP/JP]; 〒228-8583 神奈川県座間市東原五丁目 1 番 8 3 号 森永乳業株式会社 栄養科学研究所内 Kanagawa (JP). 川口 靖 (KAWAGUCHI, Yasushi) [JP/JP]; 〒228-8583 神奈川県座間市東原五丁目 1 番 8 3 号 森永乳業株式会社 栄養科学研究所内 Kanagawa (JP). 越智 浩 (OCHI, Hiroshi) [JP/JP]; 〒228-8583 神奈川県座間市東原五丁目 1 番 8 3 号 森永乳業株式会社 栄養科学研究所内 Kanagawa (JP). 井出 朋子 (IDE, Tomoko) [JP/JP]; 〒228-8583 神奈川県座間市東原五丁目 1 番 8 3 号 森永乳業株式会社 栄養科学研究所内 Kanagawa (JP). 井上 恵梨 (INOUE, Eri) [JP/JP]; 〒228-8583 神奈川県座間市東原五丁目 1 番 8 3 号 森永乳業株式会社 栄養科学研究所内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 遠山 勉, 外 (TOYAMA, Tsutomu et al.); 〒103-0004 東京都中央区東日本橋 3 丁目 4 番 10 号 ヨコヤマビル 6 階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AU, BR, CA, CN, ID, JP, KR, MX, NO, NZ, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL PEPTIDE HAVING ANGIOTENSIN CONVERTASE INHIBITORY EFFECT

(54) 発明の名称: アンジオテンシン変換酵素阻害作用を有する新規ペプチド

(57) Abstract: A peptide Met-Lys-Pro, which is obtained by chemical synthesis or hydrolysis of casein, is used as the active ingredient of angiotensin convertase inhibitors or hypotensive drugs.

(57) 要約:

化学合成、又はカゼインを加水分解することによって得られる Met-Lys-Pro からなるペプチドを、アンジオテンシン変換酵素阻害剤又は血圧降下剤の有効成分とする。

WO 03/044044 A1

明細書

アンジオテンシン変換酵素阻害作用を有する新規ペプチド

技術分野

本発明は、新規なペプチド及び同ペプチドを含有するアンジオテンシン変換酵素阻害剤に関する。アンジオテンシン変換酵素阻害剤は、食品、飼料、及び医薬として利用することができる。

背景技術

アンジオテンシン変換酵素（ACE）は、レニンによる切断によりアンジオテンシノーゲンから生じるアンジオテンシンⅠに働き、C末端の2個のアミノ酸を遊離させて、アンジオテンシンⅡに変換する酵素である。アンジオテンシン変換酵素は強い昇圧作用を有するアンジオテンシンⅡを生成させるとともに、降圧作用を有するブラジキニンを不活性化する作用も有している。このような作用から、アンジオテンシン変換酵素阻害剤は、高血圧の治療薬として使用されており、カプトプリル（三共）、レニベース（萬有製薬）などが市販薬として知られている。また、アンジオテンシン変換酵素阻害剤は、心肥大退縮効果があることも知られている。

一方、アンジオテンシン変換酵素阻害作用を有するペプチドが、天然物中に、又はカゼイン、ゼラチン等の動物性蛋白質、コムギ、コメ、トウモロコシ等の植物性蛋白質、及び、イワシ等の魚類蛋白質等の酵素分解物から見出されている。例えば、天然物中に見出されるペプチドとして、テプロタイド（ノナペプチド，SQ20881）等や、ストレプトミセス属に属する放線菌の代謝産物IS83（特開昭58-177920号公報）が知られている。また、酵素分解物としては、カゼインをトリプシンにより分解して得たペプチド類（特開昭58-109425号、同59-44323号、同59-44324号、同61-36226号、同61-36227号）、カゼインをサーモライシンにより分解して得たペプチド類（特開平6-277090号、同6-277091号、同6-279491号、同7-101982号、同7-101985号）、カゼイン等を乳酸菌あるいは、プロテイナーゼとペプチダーゼの組み合わせにより分解して得たペプチド類（特

開平6-197786号、同6-40944号、特開2001-136995号。以下、それぞれ「参考文献1～3」という。）等が知られている。参考文献1～3のペプチド類は、血圧降下作用を有する特定保健用食品として利用されている。

上記のペプチド類の中で、前記特開平7-101982号公報（以下、「参考文献4」という）記載のペプチドが、最もアンジオテンシン変換酵素阻害活性が高く、かつトリペプチドという比較的単純な構造を有している。

発明の開示

上記のように、種々のアンジオテンシン変換酵素阻害ペプチドが知られているが、これらのペプチド類では、未だ食品中の機能として、アンジオテンシン変換酵素阻害活性は不十分である。よって、天然物由来で、一層高いアンジオテンシン変換酵素阻害活性を有し、かつ単純な構造を有するペプチドの取得と、その食品又は医薬等への応用が望まれているところである。

本発明者らは、前記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、カゼインを特定の酵素で加水分解することにより、加水分解物中に高いアンジオテンシン変換酵素阻害活性を有する新規なペプチドが存在し、さらに同ペプチドがMet-Lys-Proで表される配列を有するペプチドであることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、Met-Lys-Proからなるペプチド（以下、「本発明のペプチド」ともいう）である。

また本発明は、Met-Lys-Proからなるペプチドを有効成分として含有するアンジオテンシン変換酵素阻害剤を提供する。

Met-Lys-Proからなるペプチドを有効成分として含有する血圧降下剤。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明のペプチドは、Met-Lys-Proで表される配列を有する。また、本発明のペプチドは、このペプチドの塩類であってもよい。本発明において、MetはL-メチオニン残基、LysはL-リジン残基、ProはL-プロリン残基を示す。

本発明のペプチドは、例えば、カゼイン等の蛋白質を適当な加水分解酵素で加水分解することによって、製造することができる。以下に、蛋白質を加水分解酵素で加水分解する方法を例示する。

蛋白質を酵素で加水分解するには、蛋白質の性状により処法は異なるが、可溶性の場合には、原料蛋白質を水又は温湯に分散し、溶解する。難溶性の場合には熱水に蛋白質を混合し、強力な攪拌でホモジナイズする。

蛋白質としては、M e t - L y s - P r o で表される配列を含み、適当な加水分解酵素で消化したときに本発明のペプチドが生成するものであれば特に制限されず、動物由来や微生物由来のもの等が任意に用いられる。特に好適な蛋白質は、大量に入手可能なカゼインである。

前記蛋白質を含有する溶液を70～90℃で15秒間～10分間程度加熱殺菌することが、雑菌汚染による変敗防止の点から望ましい。

次いで、前記蛋白質を含有する溶液にアルカリ剤又は酸剤を添加し、pHを使用する加水分解酵素の至適pH又はその付近に調整することが好ましい。本発明の方法に使用するアルカリ剤又は酸剤は、食品又は医薬品に許容されるものであれば如何なるアルカリ剤又は酸剤であってもよい。具体的には、アルカリ剤としては、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸カリウム等を、酸剤としては、塩酸、クエン酸、リン酸、酢酸等を例示することができる。

次に、蛋白質溶液に所定量の加水分解酵素を加え、温度10～85℃程度で0.1～48時間反応を行う。

加水分解酵素としては、蛋白質を加水分解し、本発明のペプチドを生成させ得るするものであれば特に制限されないが、エンドペプチダーゼであることが好ましい。エンドペプチダーゼとしては、バチルス (Bacillus) 属細菌由来のプロテアーゼ及び動物膵臓由来のプロテアーゼ等が挙げられる。これらの酵素は市販されており、バチルス属細菌由来のプロテアーゼとしてはバイオブラーゼ s p - 2 0 (長瀬生化学工業社製)、プロテアーゼN (天野エンザイム社製) 等が、動物膵臓由来のプロテアーゼとしてはPTN 6. 0 S (ノボザイムズ・ジャパン社製) 等が好ましいものとして例示できる。バチルス属細菌由来のプロテアーゼは、蛋白質1g当たり100～5000活性単位の割合で添加するのが望ましい。また、

動物臓器由来のプロテアーゼは、蛋白質 1 g 当たり 3 0 0 0 ～ 8 0 0 0 活性単位の割合で添加するのが望ましい。

本発明において用いる加水分解酵素は 1 種でもよく、2 種以上用いてもよい。2 種以上の酵素を用いる場合は、それぞれの酵素反応は同時に行ってもよく、別々に行ってもよい。本発明においては、ピオプラーゼ s p - 2 0、プロテアーゼ N、及び P T N 6 . 0 S を混合して使用することが特に好ましい。

酵素を添加した溶液を、酵素の種類に応じて適当な温度、例えば 3 0 ～ 6 0 ℃、望ましくは 4 5 ～ 5 5 ℃ に保持して蛋白質の加水分解を開始する。加水分解反応時間は、酵素反応の分解率をモニターしながら、好ましい分解率に達するまで反応を続ける。本発明のペプチドを得るためには、分解率は 2 0 ～ 3 0 % が望ましい。

尚、蛋白質の分解率の算出方法は、ケルダール法（日本食品工業学会編、「食品分析法」、第 1 0 2 頁、株式会社光琳、昭和 5 9 年）により試料の全窒素量を測定し、ホルモール滴定法（満田他編、「食品工学実験書」、上巻、第 5 4 7 ページ、養賢堂、1 9 7 0 年）により試料のホルモール態窒素量を測定し、これらの測定値から分解率を次式により算出する。

$$\text{分解率 (\%)} = (\text{ホルモール態窒素量} / \text{全窒素量}) \times 1 0 0$$

酵素反応の停止は、例えば、加水分解液中の酵素の失活により行われ、常法による加熱失活処理により実施することができる。加熱失活処理の加熱温度と保持時間は、使用した酵素の熱安定性を考慮し、十分に失活できる条件を適宜設定することができるが、例えば、8 0 ～ 1 3 0 ℃ の温度範囲で 3 0 分間～2 秒間の保持時間で行うことができる。

上記加水分解液物から、好ましくは本発明のペプチドを単離、精製する。ペプチドの精製は、通常、オリゴペプチドの精製に用いられているのと同様の手法、例えばイオン交換クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、分配クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー等の各種クロマトグラフィー、溶媒沈殿、塩析、2 種の液相間での分配等の方法を適宜組み合わせることによって、行うことができる。本発明のペプチドの精製に際しては、

目的物質を含む画分は、後述するアンジオテンシン変換酵素阻害作用を指標として決定することができ、それらの画分の活性成分は質量分析法により同定することができる。

また、本発明のペプチドは、化学合成によっても製造することができる。本発明のペプチドの化学合成は、オリゴペプチドの合成に通常用いられている液相法または固相法によって行うことができる。合成されたペプチドは、必要に応じて脱保護され、未反応試薬、副生物等を除去する。このようなペプチドの合成は、市販のペプチド合成装置を用いて行うことができる。目的とするペプチドが得られたことは、アンジオテンシン変換酵素阻害作用を指標として確認することができる。

本発明のペプチドは、アンジオテンシン変換酵素阻害剤の有効成分として使用することができる。本発明のペプチドは、アンジオテンシン変換酵素阻害作用及びブラジキニン不活性化抑制作用を有し、血圧降下作用を示す。したがって、高血圧に由来する種々の疾患、例えば脳出血、脳梗塞、狭心症、心筋梗塞、腎不全等に対する予防剤又は治療剤、具体的には血圧降下剤等として使用することができる。また、アンジオテンシン変換酵素阻害剤は、原因不明の本態性高血圧にも効果があることが知られており、本発明のペプチドも本態性高血圧に対する治療又は予防効果を示すことが期待される。その他、アンジオテンシン変換酵素阻害剤が有効であることが知られている心肥大、狭心病等の疾患に対しても、治療、予防薬として使用することができる。

本発明のアンジオテンシン変換酵素阻害剤は、経口投与、非経口投与のいずれによって投与されてもよいが、経口投与が好ましい。非経口投与としては、静注、直腸投与、吸入等が挙げられる。経口投与の剤型としては、錠剤、カプセル剤、トローチ剤、シロップ剤、顆粒剤、散剤、軟膏等が挙げられる。製剤化に際して、乳清蛋白加水分解物の他に、通常製剤化に用いられている賦形剤、pH調整剤、着色剤、矯味剤等の成分を用いることができる。また、公知の、もしくは将来的に見出されるアンジオテンシン変換酵素阻害作用を有する薬剤を併用することもできる。

また、本発明のペプチドを有効成分として食品中に含有させ、アンジオテンシ

ン変換酵素阻害剤の一態様として、アンジオテンシン変換酵素阻害作用を有する食品として加工することも可能である。このような食品としては、液状、ペースト状、固体、粉末等の形態を問わず、錠菓、流動食、飼料（ペット用を含む）等のほか、例えば、パン、マカロニ、スパゲッティ、めん類、ケーキミックス、から揚げ粉、パン粉等の小麦粉製品；即席めん、カップめん、レトルト・調理食品、調理缶詰め、電子レンジ食品、即席スープ・シチュー、即席みそ汁・吸い物、スープ缶詰め、フリーズ・ドライ食品、その他の即席食品等の即席食品類；農産缶詰め、果実缶詰め、ジャム・マーマレード類、漬物、煮豆類、農産乾物類、シリアル（穀物加工品）等の農産加工品；水産缶詰め、魚肉ハム・ソーセージ、水産練り製品、水産珍味類、つくだ煮類等の水産加工品；畜産缶詰め・ペースト類、畜肉ハム・ソーセージ等の畜産加工品；加工乳、乳飲料、ヨーグルト類、乳酸菌飲料類、チーズ、アイスクリーム類、調製粉乳類、クリーム、その他の乳製品等の乳・乳製品；バター、マーガリン類、植物油等の油脂類；しょうゆ、みそ、ソース類、トマト加工調味料、みりん類、食酢類等の基礎調味料；調理ミックス、カレーの素類、たれ類、ドレッシング類、めんつゆ類、スパイス類、その他の複合調味料等の複合調味料・食品類；素材冷凍食品、半調理冷凍食品、調理済冷凍食品等の冷凍食品；キャラメル、キャンディー、チューインガム、チョコレート、クッキー、ビスケット、ケーキ、パイ、スナック、クラッカー、和菓子、米菓子、豆菓子、デザート菓子、その他の菓子などの菓子類；炭酸飲料、天然果汁、果汁飲料、果汁入り清涼飲料、果肉飲料、果粒入り果実飲料、野菜系飲料、豆乳、豆乳飲料、コーヒー飲料、お茶飲料、粉末飲料、濃縮飲料、スポーツ飲料、栄養飲料、アルコール飲料、その他の嗜好飲料等の嗜好飲料類、ベビーフード、ふりかけ、お茶漬けのり等のその他の市販食品等が挙げられる。

本発明のアンジオテンシン変換酵素阻害剤において、本発明のペプチドの配合量は、アンジオテンシン変換酵素阻害剤の最終組成物に対し少なくとも0.001重量%であることが好ましい。

本発明のアンジオテンシン変換酵素阻害剤の投与量は、年齢、症状等により異なるが、通常、0.001～3000mg/日、好ましくは0.01～30mg/日であり、1日1回から3回に分けて投与してもよい。

図面の簡単な説明

図 1 は、本発明のペプチドのMS/MS分析の結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

次に、実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明する。

実施例 1 カゼインの酵素分解によるペプチドの製造

<1>カゼインの酵素分解

市販のカゼイン（ニュージーランドデーリーボード製）100gに水900gを加え、よく分散させ、水酸化ナトリウムを添加して溶液のpHを7.0に調整し、カゼインを完全に溶解し、濃度約10%のカゼイン水溶液を調製した。該カゼイン水溶液を85℃で10分間加熱殺菌し、50℃に温度調整し、水酸化ナトリウムを添加してpHを9.5に調整した後、ビオプレーゼs p-20（長瀬生化学工業社製）100,800活性単位（蛋白質1g当り1,200活性単位）、プロテアーゼN（天野エンザイム社製）168,000活性単位（蛋白質1g当り2,000活性単位）、及びPTN6.0S（ノボザイムズ・ジャパン社製）588,000活性単位（蛋白質1g当り7,000活性単位）を添加して、加水分解反応を開始した。カゼインの分解率が24.1%に達した時点で、80℃で6分間加熱して酵素を失活させて酵素反応を停止し、10℃に冷却した。この加水分解液を分画分子量3,000の限外ろ過膜（旭化成社製）で限外ろ過し、濃縮後凍結乾燥し、凍結乾燥品85gを得た。

<2>HPLCによるペプチドの分離

逆相HPLCで上記カゼイン加水分解物の分離を行った。このHPLC条件は下記HPLC条件1に示した。

〔HPLC条件1〕

カラム : カプセルパックC18（UG120、5μm）

20mm I.D. × 250mm（資生堂）

検出 : UV 215nm

流速 : 16ml/分

溶離液A : 0.05% TFAを含む1%アセトニトリル水溶液

溶離液B : 0.05% TFAを含む25%アセトニトリル水溶液

溶離液A 100%から、40分後に溶離液B 100%になるような直線グラジエント条件で、加水分解物を分離した。溶出面分について、後述する方法でアンジオテンシン変換酵素阻害能を測定したところ、アンジオテンシン変換酵素阻害能を持つペプチドは、リテンションタイム22分に溶出された。さらに、このペプチドを精製するため、さらにHPLCで精製した。このときの条件を下記HPLC条件2に示した。

〔HPLC条件2〕

カラム : カプセルパックC18 (UG300、5 μ m)
2.0 mm I. D. \times 250 mm (資生堂)

検出 : UV 215 nm

流速 : 0.2 ml / 分

溶離液A : 0.05% TFAを含む1%アセトニトリル水溶液

溶離液B : 0.05% TFAを含む10%アセトニトリル水溶液

溶離液A 100%から15分後に溶離液B 100%になるような直線グラジエント条件で、リテンションタイム13分のピークに強いアンジオテンシン変換酵素阻害能が認められた。このピークのアンジオテンシンI変換酵素阻害能は、IC50 [アンジオテンシン変換酵素の活性を50%阻害するために必要な試料濃度 (μ g/ml)] = 0.18 μ g/mlであった。

上記活性ピークの化合物を、Applied Biosystem社のプロテイン・シーケンサー (Model-473A) で同定した。その結果、Met-Lys-Proという新規な構造をもつことがわかった。更に、サーモクエスト社製質量分析計LCQにより、分子量 (M) は、374.2、 $m/z=375.2$ (MH⁺) を親イオンとするMS/MS分析により、図1に示す通り、 $m/z=260$, 215, 129等の娘イオンが検出された。

こうして、アンジオテンシン変換酵素阻害能を有するペプチドの構造は、H-Met-Lys-Pro-OHであることが明らかとなった。尚、上記凍結乾燥品85g中に、ト

トリペプチドMet-Lys-Proは、42.5mg含まれていた。

実施例 2 ペプチドの化学合成

ペプチドシンセサイザー (Model 433A型、アプライドバイオシステムズ社) を使用し、Fmoc-L-Met (アプライドバイオシステムズ社)、Fmoc-Lys(Boc) (アプライドバイオシステムズ社)、Fmoc-Pro-TrtA-PEG Resin (渡辺化学工業 (株)) を原料に用いて、固相合成法によりトリペプチドMet-Lys-Proを合成した。操作はアプライドバイオシステムズ社のマニュアルに従って行った後、脱保護した。このペプチドは、上記HPLC条件1で精製した。この物質を用いてアンジオテンシン変換酵素阻害能を測定した結果、実施例1で得られたカゼイン分解物から抽出したものとほぼ同じ値 ($IC_{50}=0.19 \mu g/ml$) が得られた。

得られたトリペプチドは、質量分析により分子量 (M) は374.2と測定され、 $m/z=375.2 (MH^+)$ を親イオンとするMS/MS分析により、図1と同様のスペクトルが得られた。

実施例 3 ペプチドのアンジオテンシン変換酵素阻害作用

アンジオテンシン変換酵素阻害の測定は、カッシュマンらの方法 [バイオケミカル・ファーマコロジー 20巻、1637～1648頁 (1971)] に準じて行った。

試料として、実施例1及び実施例2で得られたペプチド (Met-Lys-Pro)、参考文献1～3に記載のペプチド (Val-Pro-Pro、Ile-Pro-Pro)、及び参考文献4に記載のペプチド (Leu-Leu-Trp) を用いた。これらのペプチドは、いずれも実施例2と同様にして化学合成したものである。

試料を0.1Mホウ酸緩衝液 (0.3M NaClを含む、pH8.3) に溶解し、試験管に0.08 ml入れた後、0.1Mホウ酸緩衝液 (0.3M NaClを含む、pH8.3) で5mMに調整した酵素基質 (ヒプリルヒスチジルロイシン、シグマ社製) 0.2mlを添加し、37℃で3分間保温した。次いで、蒸留水を添加して0.1U/mlになるように調整したウサギ肺のアンジオテンシン変換酵素 (シグマ社製) 0.02mlを添加し、37℃で30分間反応させた。

その後、1N塩酸0.25mlを添加して反応を終了した後、1.7mlの酢酸エチルを加え、20秒間激しく撹拌し、3000rpmで10分間遠心分離して、酢酸エチル層を1.4ml採取した。得られた酢酸エチル層を加熱して溶媒を除去した後、蒸留水を1.0ml添加し、抽出したヒプリル酸の吸収（228nmの吸光度）を測定して、これを酵素活性とした。

次の式から、阻害活性を求め、IC₅₀ [アンジオテンシン変換酵素の活性を50%阻害するために必要な試料濃度(μg/ml、又はμM)] を決定した。結果を表1に示す。

$$\text{阻害率} = (A-B)/(A-C) \times 100\%$$

A：試料(ペプチド)を含まない場合の酵素活性(228nmの吸光度)

B：試料添加の場合の酵素活性(228nmの吸光度)

C：酵素および試料を添加しない場合の酵素活性(228nmの吸光度)

表 1

ペプチド	IC ₅₀ (μM)
実施例 2 のペプチド (Met-Lys-Pro)	0.5
Val-Pro-Pro	6
Ile-Pro-Pro	4
Leu-Leu-Trp	2.2

実施例 4 ペプチドの動物における血圧降下作用

<1> 試験方法

10週齢のSHR/Hos雄性ラット12匹（日本エスエルシー株式会社より購入）を、1週間の予備飼育行い、ラットの血圧を小動物非観血式自動血圧計（MK-2000，室町機械株式会社製）を用いて測定した。

収縮期血圧を指標とし、群毎の投与前の平均収縮期血圧がほぼ同じ値になるように、1群あたり6匹となるように2群に分けた後、約16時間絶食し、試験群には実施例1の<1>項で得られたカゼインの酵素分解物を注射用水に溶解し、ラ

ットに10mL/体重kg（カゼインの酵素分解物として100mg/体重kg、本発明のペプチド（Met-Lys-Pro）として0.05mg/体重kg。）の割合で経口投与し、投与2時間後に、ラットの血圧を測定した。対照群には、前記カゼインの酵素分解物水溶液の代わりに注射用水を同容量経口投与し、投与2時間後に、ラットの血圧を測定した。

<2>試験結果

結果を、表2に示す。表2から明らかとなおり、試験群において血圧降下が認められたものの、対照群では認められなかった。従って、本発明のペプチド（Met-Lys-Pro）を含むカゼインの酵素分解物に、動物に対する血圧降下作用があることが判明した。

表2

	投与前収縮期血圧 (mmHg)	投与後2時間経過時収縮期血圧 (mmHg)
試験群	182	140
対照群	184	177

実施例5 ペプチドのヒトにおける血圧降下作用

<1>試験方法

30才以上58才未満の男性志願者であって、摂取開始3週前のスクリーニング検査（医師による診察）時に収縮期血圧が140～165mmHgを示す軽症高血圧者で、かつ降圧薬による治療を受けていない9名を被験者とした。

スクリーニング検査時に測定した血圧値、喫煙の有無、及び年齢を考慮して、群間の平均化を図り、試験サンプル摂取群5名、対照群4名に割り振った。

試験サンプルとして、実施例1の<1>項で得られたカゼインの酵素分解物3g（本発明のペプチド（Met-Lys-Pro）として1.5mg含有）を、対照としてデキストリン3gを1日1回摂取させた。血圧測定（0～3週）はほぼ同時刻に測

定した。

得られた数値（収縮期血圧）を表 3 及び表 4 に示す。

得られた数値（収縮期血圧）を、統計解析ソフトウェア SPSS（エス・ピー・エス・エス株式会社製）を使用して、有意差を危険率 5% で一元配置分散分析法（例えば、市原清志著、「バイオサイエンスの統計学」，第 5 刷，株式会社南江堂，1991 年 11 月 20 日，p. 150－151 参照）により分析し、有意差のあったものについては、Dunnett の多重比較法（例えば、竹内啓、外 13 名編集，「統計学辞典」，東洋経済新報社，1989 年 12 月 4 日，p. 399 参照）により平均値の比較を行った。

表 3 試験サンプル摂取群結果（収縮期血圧単位 mmHg）

No.	投与前 (0 週目)	1 週目	2 週目	3 週目
1	162	150	149	145
2	163	160	152	160
3	157	153	136	142
4	145	137	147	137
5	145	133	139	127

表 4 対照群結果（収縮期血圧単位 mmHg）

No.	投与前 (0 週目)	1 週目	2 週目	3 週目
1	150	145	139	144
2	153	145	136	156
3	149	137	134	135
4	146	143	148	137

<2> 試験結果

統計解析ソフトウェア SPSS の分析結果として、対照群では、摂取前（0 週）に対して、投与 1、2 及び 3 週後すべてで有意差は認められなかったが、試験サン

プル摂取群では、2週及び3週後で有意な差がありとの結果が示された。従って、本発明のペプチド (Met-Lys-Pro) を含むカゼインの酵素分解物に、ヒトに対する血圧降下作用があることが判明した。

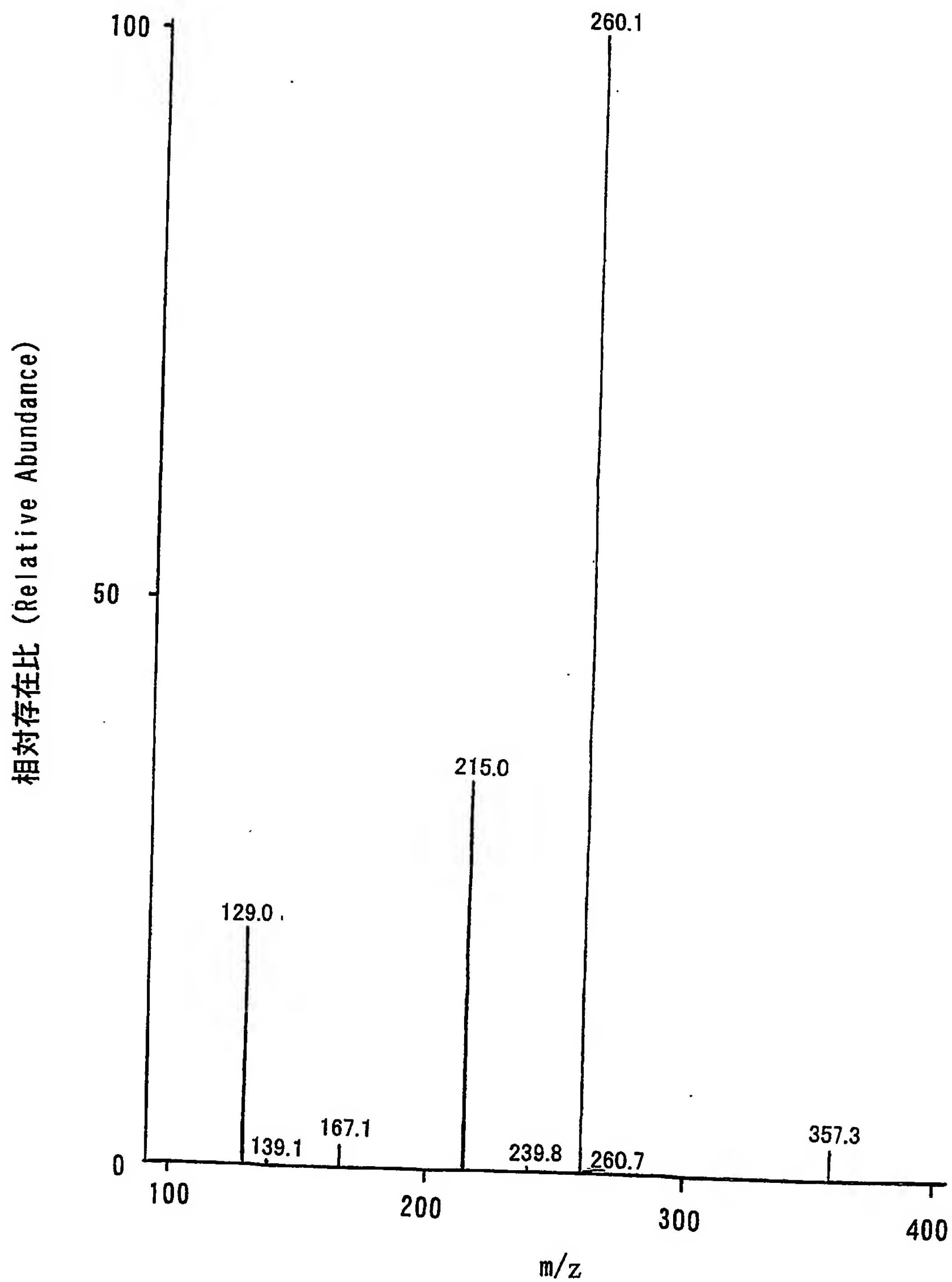
産業上の利用の可能性

本発明により、アンジオテンシン変換酵素阻害剤として有用な新規ペプチドが提供される。本発明のペプチドは、天然物由来で、低毒性で安全性が高いことから、本発明のペプチドを有効成分として食品中に含有させ、血圧降下剤の一態様として血圧降下作用を有する食品として加工することも可能である。

請求の範囲

1. Met-Lys-Proからなるペプチド。
2. Met-Lys-Proからなるペプチドを有効成分として含有するアンジオテンシン変換酵素阻害剤。
3. Met-Lys-Proからなるペプチドを有効成分として含有する血圧降下剤。

1/1

*Fig. 1*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/12197

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K5/08, A61K38/55, A61P9/00, A61P9/12, A61P43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K5/08, A61K38/55, C12N9/99

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA(STN), REGISTRY(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 7-313185 A (Marino-Forum 21), 05 December, 1995 (05.12.95), (Family: none)	1-3
A	JP 11-343297 A (The Nippon Synthetic Chemical Industry Co., Ltd.), 14 December, 1999 (14.12.99), (Family: none)	1-3

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 February, 2003 (10.02.03)

Date of mailing of the international search report

12 February, 2003 (12.02.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int.Cl ¹ C07K5/08, A61K38/55, A61P9/00, A61P9/12, A61P43/00		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int.Cl ¹ C07K5/08, A61K38/55, C12N9/99		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
CA (STN) REGISTRY (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 7-313185 A (社団法人マリノフォーラム二十一) 1995. 12. 05 (ファミリーなし)	1-3
A	JP 11-343297 A (日本合成化学工業株式会社) 1999. 12. 14 (ファミリーなし)	1-3
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列举されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p> <p>の日の後に公表された文献</p> <p>「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&」 同一パテントファミリー文献</p>		
国際調査を完了した日	10.02.03	国際調査報告の発送日
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 鈴木 恵理子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448